Aus dem Hygiene-Institut der Universität Tübingen
Abteilung Medizinische Mikrobiologie
Direktor der Abteilung: Prof. Dr. med. H. Werner

REINIGUNG DES GLYKOLIPIDS VON PSEUDOMONAS AERUGINOSA UND SEINE WIRKUNG AUF DIE NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN UND SEIN NACHWEIS IM SPUTUM VON PATIENTEN MIT CYSTISCHER FIBROSE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät
(Theoretische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
Z o u h a i r B i b i
aus
Mahares/Tunesien

1987

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543904_0131

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Tübingen
Abteilung Medizinische Mikrobiologie
Direktor der Abteilung: Prof. Dr. med. H. Werner

REINIGUNG DES GLYKOLIPIDS VON PSEUDOMONAS AERUGINOSA UND SEINE WIRKUNG AUF DIE NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN UND SEIN NACHWEIS IM SPUTUM VON PATIENTEN MIT CYSTISCHER FIBROSE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät
(Theoretische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

Z o u h a i r B i b i

aus

Mahares/Tunesien

1987

Dekan: Prof. Dr. med. H.-J. Gerth

1. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. G. Döring

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. W. Höfler

Inhaltsverzeichnis

Seite

I. EINLEITUNG 1

II. MATERIAL UND METHODEN 7

1 Gewinnung des Glykolipids 7

1.1. Kultur und Vorkultur 7

a) Vorkultur 7

b) Hauptkultur 8

1.2 Reinigung 9

a) Jarvis und Johnson-Methode 9

b) Johnson und Boese-Methode 9

c) Eigene Methode 10

1.3 Kristallisation 10

a) Jarvis und Johnson-Methode 10

b) Johnson und Boese-Methode 10

c) Eigene Methode 10

1.4 Nachweismethoden 11

1.4.1. Physikalisch-chemische Nachweismethoden 11

a) Dünnschichtchromatographie 11

b) Gaschromatographie und Massenspektrometrie 11

1.4.2 Biologische Nachweismethoden 12

2 Nachweis von spezifischen Antikörpern gegen das Glykolipid 13

3 Wirkung des Glykolipids auf polymorphkernige neutrophile Leukozyten 14

a) Reinigung der polymorphkernigen neutrophilen Leukozyten 14

b) Chemilumineszenz 15

c) Chemotaxis 16

4 Nachweis des Glykolipids in Sputen von Patienten mit cystischer Fibrose 16

Seite

4.1 Hämolysetest 17
4.2 Gaschromatographie und Massenspektrometrie 18

III. ERGEBNISSE 19

1 Gewinnung des Glykolipids 19
1.1 Reinigung und Kristallisation 19
1.2 Nachweismethoden 20
1.2.1 Chemisch-physikalische Nachweismethoden 20
a) Dünnschichtchromatographie 20
b) Gaschromatographie und Massenspektrographie 20
1.2.2 Biologische Nachweismethoden 20
2 Nachweis von spezifischen Antikörpern gegen das Glykolipid in Seren von Patienten mit cystischer Fibrose 23
2.1 Passive Hämolyse 23
2.2 Passive Hämolyse und Zusatz von Komplement 25
2.3 Passive Hämolyse mit subhämolytischer Glykolipid-Konzentration und Zusatz von Komplement 27
3 Chemilumineszenz 27
4 Chemotaxis 27
5 Nachweis von Glykolipid im Sputum von Patienten mit cystischer Fibrose 30
5.1 Passive Hämolyse 30
5.2 Gaschromatographie und Massenspektrometrie 30

IV. DISKUSSION 32

V. ZUSAMMENFASSUNG 35

LITERATURVERZEICHNIS 36

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. K. Botzenhart für seine vielfältige Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Privatdozent Dr. G. Döring für die Überlassung dieses Themas, sein stets vorhandenes Interesse am Fortgang der Arbeit und für seine Unterstützung in jeder Hinsicht.

Mein Dank gilt auch:

- Herrn Dr. R. Kownatzki, Medizinische Hochschule Hannover für seine maßgebliche Hilfe bei der Durchführung der gaschromatographischen und massenspektrometrischen Analysen.

- Herrn Dr. A. Kharazmi, Serum Institut Rigshospitalet Kopenhagen Dänemark, für seine Unterstützung bei der Durchführung von einigen Versuchen.

- Frau Margarita Krause für die Anfertigung des Manuskriptes.

- Allen Mitarbeitern des Hygiene Instituts.

I. Einleitung

Pseudomonas aeruginosa (Synonym: Pseudomonas pyocyaneum) ist ein aerobes, gram-negatives, begeißeltes Stäbchen, das der Erreger zahlreicher unterschiedlicher Krankheiten ist.

Die geringen Wachstumsansprüche und die hohe Resistenz gegenüber Desinfektionsmitteln und Chemotherapeutika machen P.aeruginosa zum Problemkeim der nosokomialen Infektion par Excellence. Da der Keim normalerweise auf der Haut und im Intestinaltrakt des Menschen angesiedelt ist, müssen für das Auftreten von P.aeruginosa-Infektionen besondere Bedingungen vorliegen. Begünstigt wird das Auftreten von P.aeruginosa als pathogener Keim durch eine geschwächte Immunabwehr des Organismus oder eine konsumierende Erkrankung wie z.B. bei Leukämiepatienten, Patienten mit Strahlen- und Zytostatikatherapie aufgrund der Immunsuppression sowie bei Patienten mit Brandwunden. Bei letzteren ist einerseits die Abwehrlage ziemlich beeinträchtigt, andererseits herrschen günstige Vermehrungsbedingungen für die Bakterien in den Wunden. Auch bei Patienten, bei denen eine Dauerbehandlung mit Breitband-Antibiotika vorgenommen wurde und bei Patienten mit cystischer Fibrose, sind Infektionen mit P.aeruginosa gefährliche Komplikationen (22).

Auf die Gruppe von Patienten mit cystischer Fibrose (CF), deren Lunge oft eine P.aeruginosa-Ansiedlung aufweist (siehe unten), soll hier näher eingegangen werden. Die cystische Fibrose (oder Mucoviscidose, wie sie in Deutschland gewöhnlich genannt wird) ist die häufigste Erbkrankheit mit letalem Ausgang im Kindesalter. Bei einer von 1000 bis 2000 Geburten wird der Gendefekt beobachtet (8).

Die pathophysiologischen Veränderungen sind die Folge der Störung der Funktion der exokrinen Drüsen. Das klinische Bild wird geprägt durch die Komplikationen im Bereich des Verdauungstraktes und der Lunge.

Die pulmonale Verlaufsform der CF bedroht das Leben des Patienten am meisten. Der zähe Drüsenschleim, dessen abnorme Viskosität vor allem

auf den verminderten Wassergehalt zurückzuführen ist, verstopft die Bronchien und Bronchiolen. Es kommt zu rezidivierenden Bronchitiden und Pneumonien. Das hochvisköse Sekret ist eiweißreich und bildet einen guten bakteriellen Nährboden. Früher wurde am häufigsten Staphylococcus aureus aus dem Sputum von CF-Patienten isoliert (4). In den letzten Jahren ist jedoch P.aeruginosa der dominierende Keim im Respirationstrakt dieser Patienten geworden (56).

Anzumerken ist, daß trotz der geringen Invasivität der Bakterien eine starke lokale Gewebszerstörung der Lunge zu beobachten ist. Die Besiedlung der Lunge mit P.aeruginosa und die pathologischen Veränderungen der Lunge scheinen parallel zu laufen (13, 18, 19).

Durch eine Vielzahl von Studien ist an der Bedeutung des P.aeruginosa als gefürchtetem Krankheitserreger, bei entsprechender Disposition, nicht mehr zu zweifeln (61, 64).

Zu den besonderen Merkmalen des P.aeruginosa gehört die Bildung einer Reihe von extrazellulären Produkten. Darunter befinden sich mehrere Virulenzfaktoren, auf die wenigstens zum Teil die pathogene Wirkung und die Ausbreitungsfähigkeit dieser Mikrobenart zurückzuführen sein dürfte (61, 64): Exotoxin A, alkalische Protease, Elastase, Glykolipide und andere. In welchem Maß diese Produkte zum Krankheitsgeschehen bei CF-Patienten beitragen, ist noch nicht ganz geklärt.

Das Exotoxin A, ein hitzelabiles Protein, ist das toxischste dieser Stoffwechselprodukte. Es ist letal für Kaninchen, Ratten und Hunde (58) und seine LD_{50} für Mäuse liegt bei 70 mg (6). Die Toxizität dieses Toxins wurde in vitro durch Hemmung der Proteinsynthese nachgewiesen (21, 47, 54). In vivo wurde die Bildung des Toxins bei Patienten mit P.aeruginosa-Infektion durch den Nachweis von spezifischen Antikörpern gegen das Toxin in den Seren dieser Patienten bewiesen (7, 24, 34, 58). Die Möglichkeit, Tiere durch Immunisierung gegen das Toxin zu schützen (58, 63), beweist die Pathogenität des Toxins. Ferner konnte gezeigt werden, daß Exotoxin-A-positive Stämme virulenter sind als Exotoxin-A-negative Stämme bei Brandwundeninfektionen (63).

Zwei Proteasen, die alkalische Protease und die Elastase, die möglicherweise zur Pathogenese der P.aeruginosa-Infektion der Lunge beitragen, sind seit langem bekannt (48, 49, 50, 51, 52).

Die alkalische Protease und die Elastase sind zwei extrazelluläre Enzyme, deren Beteiligung als Virulenzfaktoren bei P.aeruginosa-Infektionen durch mehrere Arbeiten untersucht wurden: So können sie eine Schädigung der Hornhaut hervorrufen (35), und Plasmaproteine wie Immunglobuline, Transferrin und Haptoglobin werden durch sie gespalten (9, 53, 60). Hämmorhagien und Nekrosen der Haut (41) sowie der Lunge von Mäusen und Kaninchen (46) können diese Proteasen verursachen. Von Kharazmi et al. wurde eine Hemmung der Chemotoxis und des O_2-Verbrauchs der Leukozyten durch die Proteasen nachgewiesen (29, 30). Ferner wurde eine spezifische Antikörperbildung gegen die Elastase und die Protease bei CF-Patienten mit P.aeruginosa-Pneumonien festgestellt (10, 11, 12, 20).

Als einziges gram-negatives Bakterium produziert P.aeruginosa mehrere extrazelluläre Glykolipide, deren Zuckerkomponente Rhamnose und deren Fettsäurekomponente β-hydroxydecansäure ist, die sich strukturell im Verhältnis dieser Komponenten unterscheiden (39). Von diesen Glykolipiden ist das von Jarvis und Johnson (25) sowie von Edwards und Hayashi (14) strukturell aufgeklärte Rhamnolipid (GL) am besten untersucht. Das GL (Synonym: Rhamnolipid, Abb. 1) ist aus zwei Molekülen Rhamnose (einem in Bakterienzellwänden vorkommenden Desoxyzucker) und zwei Molekülen β-hydroxydecansäure zusammengesetzt, wie Jarvis und Johnson 1949 herausfanden (25). Es hat ein Molekulargewicht von ca. 650 und eine relative Toxizität mit einer LD_{50} von $4 \cdot 10^3$ mg GL pro kg Körpergewicht bei Mäusen (40).

Die Beteiligung des GL an der Zerstörung der Lunge bei CF-Patienten ist wenig erforscht. Mit seiner hämolytischen Potenz (62) stellt das GL ein möglicherweise pathogenes Agens von P.aeruginosa dar. Hingley et al. (16) haben eine Membranalteration sowie eine Inhibition der Motalität der Kinozilien des respiratorischen Epithels einer präpartierten Kaninchen-Trachea durch das GL festgestellt. Das GL, das sowohl hydrophile wie hydrophobe (lipophile) Gruppen besitzt, wirkt als Detergens.

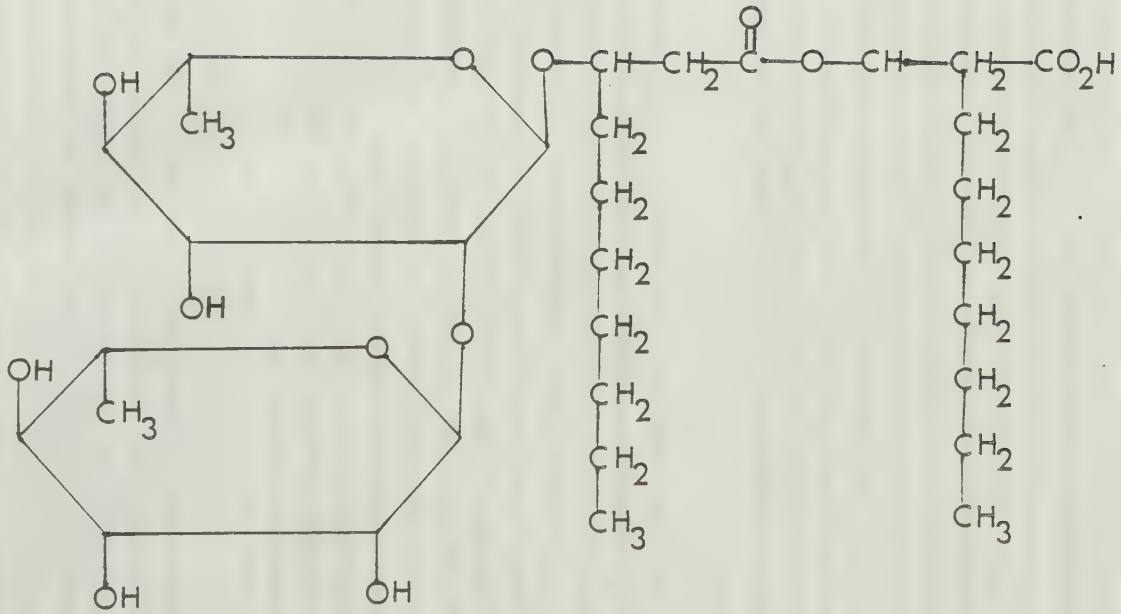

Abb. 1: Das Glykolipid (14)

Formel 2-o-α-L-rhamniopyranosyl-α-L-rhamnopyranosyl- β-hydroxydecanoyl- β-hydroxydecanoate

Durch diese Eigenschaft wird die Solubilisierung von Phospholipiden erleichtert und dadurch deren Spaltung durch die Phospholipase C, ein ebenfalls von P.aeruginosa sekretierter Virulenzfaktor, erleichtert (36). Dieses Zusammenwirken von GL und Phospholipase C könnte bei P.aeruginosa-Pneumonien, bei der die Phospholipide des Surfacants-Systems gespalten werden könnten, einen weiteren Pathogenitätsmechanismus des GL darstellen (40, 43). Um überhaupt die Bedeutung des GL als Virulenzfaktor bei der CF zu beweisen, müßte eine in-vivo-Bildung nachgewiesen werden. Dies ist prinzipiell durch den direkten Nachweis des GL in Patientensputen möglich als auch möglicherweise durch den Nachweis spezifischer anti-GL Antikörper in Patientenseren. Beide Möglichkeiten sind bisher noch nicht bei CF-Patienen angewandt worden.

Obwohl das GL ein Molekulargewicht von ca. 650 besitzt und damit immunologisch gesehen als Hapten (unvollständiges Antigen) klassifiziert wird, das keine Immunantwort hervorruft, ist es möglicherweise doch in der Lage, eine Antikörperbildung zu induzieren. Einerseits kann es sich in vivo an zirkulierende Proteine wie beispielsweise an Albumin auf Grund seiner hydrophoben Eigenschaften binden (5, 37, 45), andererseits ist es denkbar, daß es mit Hilfe seiner Fettsäurekomponenten einzeln oder in größeren Verbänden an Zelloberflächen adhäriert und somit antigene Eigenschaften erhält. Löffler erzielte durch Einbau des GL in Liposome und folgende Immunisierung von Kaninchen eine Antikörperbildung gegen das GL (44). Da Lipide (31) im Gegensatz zu Zuckern (67) sehr wahrscheinlich nicht antigen wirksam sind, nahm Löffler an, daß sich die Immunantwort gegen die Zuckerkomponente des GL gerichtet hat. Spezifische anti-GL Antikörper, die gegen die Zuckerkomponente des Moleküls gerichtet sind, hemmen möglicherweise die hämolytische Wirkung des GL (44) oder verstärken sie. Die letztere Eigenschaft der spezifischen Antikörper wurde bei den Versuchen von Löffler gefunden, der durch Zugabe von Komplement zu Erythrozyten, gereinigtem GL und spezifischen Kaninchen-Antikörpern eine signifikante Erhöhung des Hämolysetiters erhielt (44).

In der vorliegenden Arbeit soll dieses serologische Nachweissystem für GL-Antikörper übernommen werden und auf CF-Patienten angewandt werden. Seren dieser Patienten, die unter einer chronischen P.aerugi-

nosa-Lungeninfektion leiden, sollen daher sowohl mit als auch ohne Komplement-Zusatz auf spezifische Antikörper untersucht werden.

Da auch der direkte GL-Nachweis bei diesen Patienten noch aussteht, sollen in der vorliegenden Arbeit Sputen dieser Patientengruppe mit Hilfe physikalischer und biologischer Nachweismethoden auf diese Substanz hin untersucht werden.

Histologische Untersuchungen bei CF-Patienten mit chronischer P.aeruginosa-Pneumonie ergaben, daß 70% der phagozytären Zellen in den Lungen polymorphkernige Leukozyten (PMN) waren (27, 55). Da die PMN in der Immunabwehr bei Patienten mit P.aeruginosa-Infektion eine wichtige Rolle spielen, soll in dieser Arbeit eine eventuelle Wirkung des GL auf PMN untersucht werden.

Für die Gewinnung des GL wird mit verschiedenen aus den zahlreichen in der Literatur (15, 36, 40) angegebenen Medien gearbeitet, um die produzierten Mengen zu vergleichen. Da auch sehr viele verschiedene Reinigungsverfahren angegeben sind (15, 26), sollen diese jeweils untersucht, eventuell kombiniert bzw. verbessert werden.

II. Material und Methoden

1 GEWINNUNG DES GLYKOLIPIDS

In der vorliegenden Arbeit wurde mit vielen in der Literatur (15, 36, 41) für P.aeruginosa angegebenen Kulturmedien gearbeitet. Dabei wurde untersucht, in welchem Medium die GL-Produktion am größten ist. Die meisten der Medien unterscheiden sich vor allem in dem Kohlenstoff-Donator, bei dem es sich meistens um Glucose (36) oder Glycerin (15) handelt.

Beim Vergleich der GL-Produktion wurde stets der gleiche P.aeruginosa-Stamm sowie die gleichen Reinigungs- und Kristallisationsmethoden verwendet. Anzumerken ist, daß die Reinigung und die Kristallisation bzw. die Gewinnung des GL sich als sehr schwierig erwiesen hat.

1.1 Kultur und Vorkultur

Es ist bekannt, daß die verschiedenen P.aeruginosa-Stämme unterschiedlich starke GL-Produktionen besitzen und daß der P.aeruginosa-Stamm 3 sogar kein GL produziert. In dieser Arbeit wurden vor allem die P.aeruginosa-Stämme 6 und 7 (des Hygiene-Instituts der Universität Tübingen) verwendet, mit denen die beste GL-Produktion erzielt worden ist.

Für die Vorkultur wurden 2 Blutagarplatten mit den jeweiligen P.aeruginosa-Stämmen beimpft, die 24 Stunden im Brutschrank bei einer Temperatur von 37 °C inkubiert wurden.

a) Vorkultur

20 ml des Trypticase Soy Broth-Medium wurde in einem 100 ml Erlenmeyerkolben mit 3 Schikanen (30 min, 121° C) autoklaviert. Danach wurde das Medium mit einer Öse des Bakterienstammes aus den Blutagarplatten beimpft und 24 Stunden bei 37°C im Schüttelschrank bei 140 rev/min geschüttelt.

b) Hauptkultur

Zur Hauptkultur wurden die drei folgenden Medien verwendet:

Medium nach Kurioka

Zusammensetzung:

0,29% DL-Glutaminsäure
0,13% DL-Alanin
0,01% $Cacl_2$
0,01% $MgSO_4$
0,01% $ZnSO_4$
0,61% Glucose
0,43% NaCl
3 % eines folgendermaßen gewonnenen Dialysats:

74 g 'brain-heart infusion powder' (Difco) in 200 ml destilliertem Wasser lösen, Suspension in 4 l aqua dest. bei 4°C 12 Stunden dialysieren mit NaOH auf pH 7 einstellen.

Medium nach Liu

Zusammensetzung:

0,3 % L-Alanin
0,3 % Asparaginsäure
0,3 % Glutaminsäure
1,2 % Glucose
0,003% KH_2PO_4
0,01 % $CaCl_2$
0,01 % $MgSO_4$
0,3 % NaCl

Medium nach Hauser und Karnovsky

Zusammensetzung:

7 % K_2HPO_4
3 % KH_2PO_4
0,1% $MgSO_4 7(H_2O)$
1 % $(NH_4)_2SO_4$
30 % Glycerin (94%)

Es wurde wie nachstehend mit jedem Medium weitergearbeitet: Das Medium wurde auf pH 7,4 mit einer 1N NaOH-Lösung eingestellt und autoklaviert (10 min, 115°C).

Zu 200 ml Medium in einem 1 l Erlenmeyerkolben mit 3 Schikanen (wichtig für aerobe Bedingungen) wurde 1 ml der Vorkultur gegeben. Anschließend wurde es 5 Tage im Schüttelschrank bei 32°C und 80 rev/min inkubiert. Es wurde allerdings stets mit 4 l Medium, auf 16 Erlenmeyerkolben mit 3 Schikanen verteilt, gearbeitet, um eine höhere Menge des GL zu gewinnen.

1.2 Reinigung

Zur Gewinnung des GL bzw. dessen Reinigung und Kristallisation werden in der Literatur verschiedene Methoden angegeben. In dieser Arbeit wurde mit den folgenden Methoden gearbeitet bzw. sie verglichen:

a) Jarvis und Johnson-Methode

Wie bei Jarvis und Johnson (25) wurden die Bakterien - nach den 5 Tagen Inkubation im Schüttelschrank - bei 8000 U/min und 4°C für 5 min abzentrifugiert. Die Bakterienmasse wurde verworfen und der Überstand wurde mit konzentrierter H_2SO_4 (98% rein) auf pH 2 eingestellt und mindestens 3 Tage im Kühlschrank bei einer Temperatur von 4°C aufbewahrt. Die entstandenen Kristalle wurden durch Filtration gewonnen und in einem kleinen Volumen an Äther aufgelöst. Der Rückstand wurde abgeworfen.

b) Johnson und Boese-Methode

Bei Johnson und Boese (26) wurde der Überstand der Hauptkultur, nachdem die Bakterien abzentrifugiert worden waren, autoklaviert (10 min, 115°C). Das GL wurde an Aktiv-Kohle (E. Merck AG, Darmstadt) adsorbiert, indem sie den Überstand durch ein Filter mit Aktiv-Kohle laufen ließen. Die Aktiv-Kohle wurde dann mit absolutem Äthanol (98%, E. Merck AG, Darmstadt) gewaschen, um das GL, das in Äthanol gut löslich ist, in Lösung zu halten.

c) Eigene Methode

Nach der Erprobung der oben genannten Methoden wurde diese Methode entwickelt. Sie stellt eine Kombination mit einigen Modifikationen der beiden Methoden dar: Wie bei Jarvis und Johnson wurde, nach der Säureausfällung und 3 Tagen Aufbewahrung im Kühlschrank, das Präzipitat abzentrifugiert (8000 U/min bei 4°C, 20 min).

Für die Reinigung des GL wurde die Methode von Johnson und Boese angewendet. Allerdings wurden einige Änderungen vorgenommen: Das Zentrifugat wurde in absolutem Äthanol (98%) gelöst und mit Aktivkohle 3 bis 4 mal gewaschen, bis die Lösung klar wurde.

Die Äthanollösung, in der sich das GL befand, wurde dann konzentriert, indem das Äthanol mit Rotationsverdampfer abgezogen wurde.

1.3 Kristallisation

a) Jarvis und Johnson-Methode

Wie Jarvis und Johnson wurde zu der Äther-GL-Lösung (siehe 1.2) Petrol-Äther zugefügt. Die entstandenen Kristalle wurden dann in Dioxan gelöst und durch Zusatz von Wasser und Abkühlung wieder kristallisiert.

b) Johnson und Boese-Methode

Die Äthanol-GL-Lösung wurde wie Johnson und Boese (siehe 1.2) gegen Wasser und dann gegen Kochsalz bei 4°C dialysiert. Die entstandenen Kristalle wurden dann abzentrifugiert.

c) Eigene Methode

Die konzentrierte Äthanol-GL-Lösung wurde in einen Dialyseschlauch (Serva, Heidelberg) gefüllt und über Nacht im Kühlschrank bei einer Temperatur von 4°C gegen 3 l destilliertes Wasser dialysiert. Man erhält

ein trübes Dialysat und, ohne dieses umzufüllen, wurde noch einmal über Nacht im Kühlschrank (bei 4°C) gegen 5 Mol NaCl gelöst in 3 l destilliertem Wasser dialysiert. Das Dialysewasser wurde in beiden Fällen auf pH 4 mit 0,1 N HCl eingestellt.

Die entstandenen farblosen Kristalle wurden dann abzentrifugiert (2000 U/min) und lyophilisiert.

1.4 Nachweismethoden

1.4.1 Physikalisch-chemische Nachweismethoden

a) Dünnschichtchromatographie

Wie Johnson und Boese (26) wurde auch hier die Dünnschichtchromatographie als Nachweismethode für das GL verwendet. Nachdem 1 mg GL in 5 ml Diäthyläther gelöst worden waren, wurde die Lösung mit Hilfe einer Kapillare auf einer Startlinie 2 cm vom unteren Rand der Folie (DC-Alufolie Kieselgel 60 F_{254}, Schichtdicke 0,2 mm, E. Merck) punktförmig aufgetragen. Dann wurde diese Folie in eine geschlossene Kammer gestellt, in der sich die mobile Phase Chloroform/Methanol/Wasser (480:120:9) befand.

Nach ca. 120 min, wenn die Imprägnierungsfront etwa 4 cm vom oberen Rand der Folie entfernt war, wurde die Folie aus der Kammer genommen und, nach der Markierung der Front der mobilen Phase, etwa 20 min bei Raumtemperatur getrocknet.

Dann wurde die Folie unter dem Abzug mit dem Reagenz (2',7'-Dichlorfluorescein, Sprühreagenz 0,1%, E. Merck) besprüht und 5 min bei Raumtemperatur getrocknet und danach unter UV-Licht betrachtet.

b) Gaschromatographie und Massenspektrometrie

Die gaschromatographischen und die massenspektrometrischen Analysen wurden verwendet, um die einzelnen Komponenten der GL-Präparation

zu identifizieren. Diese Untersuchungen wurden von Herrn Dr. Reinhard Kownatzki, Medizinische Hochschule Hannover, Zentrum Biochemie, durchgeführt. Die GL-Präparation wurde in Methanol gelöst (1 mg/1 ml) und 30 min im Ultraschalldesintegrator beschallt, dann wurde der Niederschlag abzentrifugiert. Der Überstand wurde durch Glaswolle filtriert, dann im Rotationsverdampfer zum Trocknen eingeengt und der Rückstand ausgewogen. 0,5 mg des Rückstandes wurden in 1 ml Methanol gelöst und mit 40 µg Arabitol versetzt. Die Lösung wurde mit demselben Volumen einer Lösung aus 0,5 M HCl in Methanol versetzt und anschließend wurde sie 4 Stunden bei 70°C im Trockenschrank inkubiert. Das Lösungsmittel wurde bis zum Trocknen im Vakuum abgezogen und der Rückstand wurde mit 100 µl Pyridin neutralisiert und anschließend evaporiert. Der Rückstand wurde dann in 100 µl Pyridin gelöst und mit 100 µl N,0-bis (Trimethylsilyl)-Trifluoracetamiol (Pyridin/BSTFA 1:1) 60 min bei 70°C persilytiert; anschließend erfolgte die gaschromatographische Analyse.

Die einzelnen Komponenten wurden anhand der logarithmischen Retentionsindices, bezogen auf die N-Alkane C_{13} bis C_{20}, sowie über ihre Massenspektren identifiziert (57).

1.4.2 Biologische Nachweismethoden

Wie in der Einleitung ausgeführt, wurde die hämolytische Eigenschaft des GL in vitro nachgewiesen (44, 62). Hierbei wurden PVC-U-Miktrotiterplatten (Becton-Dickinson, Heidelberg) benutzt. Pro Näpfchen wurden 10 µl einer 10%igen gewaschenen menschlichen Erythrozyten-Suspension in Veronalpuffer pH 7,2 verwendet. Diese 10%ige Suspension wurde wie folgt hergestellt:

Bei der Blutentnahme, die bei einer gesunden Person erfolgte, wurden alle Einflußgrößten (langes Stauen, starkes Aspirieren usw.) berücksichtigt. Anschließend erfolgte die Zentrifugation des mit EDTA ungerinnbar gemachten Blutes bei 1800 U/min für 10 min. Höhere Umdrehungsgeschwindigkeiten bei gleicher Laufzeit oder eine längere Laufzeit verursachen Hämolyse. Das Plasma wurde für die serologischen Versuche verwendet.

Zu dem Zentrifugat wurde das doppelte Volumen an physiologischer Kochsalzlösung (0,9%) zugefügt und 3 bis 4 mal behutsam umgeschüttelt und wieder zentrifugiert (1800 U/min, 10 min). Der Überstand wurde verworfen und die Prozedur 2 bis 3 mal wiederholt, bis der Überstand klar war. Das so gewonnene Konzentrat aus gewaschenen menschlichen Erythrozyten (das Zentrifugat) kann man 2 bis 3 Tage im Kühlschrank (4°C) aufbewahren und bei Bedarf wieder verwenden. Zu 1 ml aus diesem Konzentrat wurden 9 ml Veronalpuffer pH 7,2 zugefügt, wodurch man eine 10%ige Suspension erhält (1 µl davon enthält $780 \cdot 10^3$ Erythrozyten).

Weiterhin wurden pro Näpfchen der Mikrotiterplatten 50 µl einer entsprechenden Verdünnung einer 8-stufigen 1:2 GL-Verdünnungsreihe zugegeben. Zur Herstellung einer GL-Verdünnungsreihe wurden 5 mg GL in 5 ml Veronalpuffer pH 7,2 gelöst und mit NaOH auf pH 7,2 eingestellt, so daß beim GL-Titer 1:1 der Verdünnung 0,05 mg GL vorlagen. Anschließend wurde mit weiterem Veronalpuffer verdünnt. Durch Zusatz von 85 µl Veronalpuppfer pH 7,2 wurde das Gesamtvolumen pro Näpfchen auf 145 µl konstant gehalten. Als Kontrolle unter sonst gleichen Bedingungen wurden 50 µl Veronalpuffer anstelle der GL-Lösung mitgeführt. Beurteilt wurde eine 100%ige Lyse der Erythrozyten nach 120 min im Brutschrank bei 37°C.

2 NACHWEIS VON SPEZIFISCHEN ANTIKÖRPERN GEGEN DAS GL

Für den Nachweis spezifischer Antikörper gegen das GL wurden Seren von CF-Patienten mit einer gesicherten chronischen P.aeruginosa-Pneumonie verwendet. Diese Seren wurden freundlicherweise von verschiedenen Krankenhäusern und mikrobiologischen Abteilungen (Frankfurt, Pforzheim, München, Hannover, Kopenhagen) zur Verfügung gestellt. Die Versuche wurden auf PVC-U-Mikrotiterplatten (Becton-Dickinson bzw. Falcon Plastics, Heidelberg) durchgeführt. Die Gesamtflüssigkeitsmenge pro Näpfchen wurde auf 145 µl konstant gehalten. Für Flüssigkeitszusätze, Herstellung einer GL-Verdünnungsreihe und Kontrollen wurde Veronalpuffer pH 7,2 verwendet. Stets wurden 10 µl einer 10%igen Lösung von gewaschenen menschlichen Erythrozyten (Herstellung siehe II.1.4.2) benützt. Für Komplementzusätze wurden 25 µl Kaninchenkomplement

(lyophilisiert, Behringwerke, Marburg, gelöst in destilliertem Wasser und mit Veronalpuffer pH 7,2 ca. 1:5 weiterverdünnt) verwendet. Zur Kontrolle wurden Seren von gesunden Probanden benützt. Die Reihenfolge: GL-Verdünnungsreihe, Serum, Komplement, Veronalpuffer, Erythrozyten etc. wurde in allen Versuchen berücksichtigt.

Außerdem galt für diese serologischen Versuche, daß sie wie alle in dieser Arbeit vorkommenden Versuche auf Mikrotiterplatten dreifach ausgeführt wurden. Beurteilt wurde eine 100%ige Lyse der Erythrozyten nach einer Inkubationszeit von 120 min bei 37°C im Brutschrank.

3 WIRKUNG DES GL AUF POLYMORPHKERNIGE NEUTROPHILE LEUKOZYTEN

Die polymorphkernigen neutrophilen Leukozyten (PMN) spielen in der Immunabwehr bei Patienten mit P.aeruginosa-Lungeninfektion eine wichtige Rolle (3, 27, 55, 65, 68). In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung des GL auf zwei wichtige Funktionen der PMN, die Chemotaxis und die Chemilumineszenz, untersucht. Diese Untersuchungen wurden größtenteils am Statens Seruminstitut Copenhagen (Dänemark) bei Dr. Arsalan Kharazmi durchgeführt.

a) Reinigung der PMN (2, 65)

Von einer gesunden Person wurde Blut abgenommen und mit Citrat ungerinnbar gemacht. Anschließend wurden 10 ml dieses Blutes mit 2 ml Dextran (MG: 250 000) versetzt und 45 min bei Raumtemperatur stehen gelassen, um eine Sedimentation der Erythrozyten zu erzielen (2, 65). 6 ml des Buffy Coat (der Überstand) wurden durch langsame Zugabe zu 4 ml Lymphoprep (Nyegaard, Oslo, Norwegen) zugegeben und zentrifugiert (2000 U/min, 20 min). Bei höherer Umdrehungsgeschwindigkeit würden auch die restlichen Leukozyten abzentrifugiert werden. Der Überstand wurde dann verworfen und die restlichen Erythrozyten, die die abzentrifugierten PMN kontaminieren, wurden durch einen 'hypotonischen Schock' lysiert, der wie folgt durchgeführt wurde: Das

Zentrifugat wurde 30 sec mit 3 ml einer 0,2 NaCl-Lösung gemischt und geschüttelt und gleich danach wurden 3 ml einer 1,5% NaCl-Lösung dazugesetzt und zentrifugiert (1000 U/min, 10 min). Der hypotonische Schock wurde so oft wiederholt, bis keine Erythrozyten sichtbar waren.

Die zentrifugierten PMN wurden in Gey's Puffer suspendiert und dazu wurden 1 % human Albumin (Statens Seruminstitut, Kopenhagen), 167 I.U./ml Penicillin (Novo, Kopenhagen) und 50 µg/ml Streptomycin (Rosco, Kopenhagen) gesetzt. Diese PMN-Suspension wurde auf pH 7,2 eingestellt und nach Zählung der PMN wurde sie mit Gey's Puffer weiterverdünnt, bis 1 ml dieser Suspension $1 \cdot 10^6$ PMN enthielt.

b) Chemilumineszenz

Die Chemilumineszenz wurde nach der Methode von Allen et al. (1) mit einigen Modifikationen (30) gemessen. Aus einer GL-Lösung (1 mg/1 ml Gey's Puffer) wurden verschiedene Konzentrationen hergestellt. In Propylen-Röhrchen (Nunc, Roskilde, Dänemark) wurde zu je 1,2 ml der verschiedenen GL-Konzentrationen 1,2 ml PMN ($1 \cdot 10^5$ PMN/ml) zugesetzt und 30 min bei 37°C inkubiert. Aus einer GL-Stammlösung (1 mg/ 1 ml Gey's Puffer) wurden die GL-Verdünnungen 1:100, 1:200, 1:500 und 1:1000 hergestellt. Als Kontrolle wurden die PMN in Gey's Puffer 30 min präinkubiert.

Als Stimulans der Chemilumineszenz (enhanced chemiluminescence) wurde Luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione, Sigma, St. Louis, Mo., USA) verwendet. 10 mg Luminol wurden in 1 ml NaOH 0,1N aufgelöst und mit Krebspuffer auf 1:10 000 verdünnt.

Das f-MLP (Formylmethionyl-Leucyl-Phenylalanin, Sigma, St. Louis, Mo., USA) wurde in einer Konzentration von 10^{-5} mM f-MLP/ml Krebspuffer als 'Attractant' verwendet.

Unter Rot-Licht wurden je 1 ml der in GL inkubierten PMN, 4 ml Krebspuffer, 50 µl Luminol (1:10 000) und 0,5 ml f-MLP (10^{-5} mM/ml) zugesetzt und in Szintillationsampullen aus Glas (Packart, Kopenhagen, Dänemark) umgefüllt und dann in den Szintillationszähler (Beckmann L,

8000 Scintillationscounter, Fullerton CA. USA) gestellt. Die Meßwerte wurden alle 10 min registriert und die Meßzeit betrug mindestens eine Stunde.

c) Chemotaxis

Die chemotaktische Aktivität der PMN wurde in Boyden-Kammern (Molytex, Rødovre, Dänemark) bestimmt (2, 65). Als chemotaktisches Agens wurde ein Filtrat aus einer E-Coli-Kultur (Statens Seruminstitut Kopenhagen, Dänemark) verwendet. Eingesetzt wurden 0,5 ml des chemotaktischen Agens in dem unteren Abschnitt der Kammer. In den GL-Verdünnungen (1:10, 1:100, 1:200 und 1:2000, Stammlösung 1 mg/1 ml Gey's Puffer) wurden die PMN in einer Endkonzentration von $1 \cdot 10^6$ PMN/ml 30 min präinkubiert. In dem oberen Abschnitt der Kammer wurden 0,5 ml der verschiedenen GL-Konzentrationen mit präinkubiertem PMN (10^6 PMN/ml) eingesetzt. Beide Abschnitte der Kammer sind mit einem Filter (Porengröße 3 µm, Sartorius, Göttingen) abgetrennt. Als Kontrolle wurden die PMN in Gey's Puffer inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 2,5 Stunden wurden die Filter entfernt, in 96% Äthanol fixiert und mit Hematoxylin gefärbt. Die zu dem unteren Abschnitt der Kammer durchgewanderten PMN, die sich demzufolge auf der unteren Seite des Filters befanden, wurden gezählt. Die Versuche wurden dreifach durchgeführt und auf 5 Feldern jedes Filters wurden die PMN gezählt. Die Hemmung der Chemotaxis wurde bestimmt durch den Vergleich der Zahl der durchgewanderten PMN, preinkubiert in GL-Verdünnung mit der Zahl der gezählten PMN bei der Kontrolle.

4. NACHWEIS DES GL IN SPUTEN VON PATIENTEN MIT CYSTISCHER FIBROSE

Die Sputen wurden von CF-Patienten mit einer gesicherten chronischen P.aeruginosa-Pneumonie gewonnen. Sie stammen ebenfalls von den bereits genannten Institutionen (siehe II.2).

4.1 Hämolysetest

Die Sputen wurden wie folgt bearbeitet:

Methode A:

Es wurden 10 mg Dithiothreithol (DTT) in 100 ml destilliertem Wasser aufgelöst. In einem Verhältnis von 1:1 wurden die Sputen mit der DTT-Lösung gemischt und auf dem Vortex-Mixer (Vortex, Heidolph) 10 min geschüttelt. Anschließend erfolgte eine 10-minütige Zentrifugation (8000 U/min bei 10°C). Der Überstand wurde für die nachfolgenden Hämolysetests verwendet und das Zentrifugat weiterverarbeitet (siehe unten). Der pH eines Sammelsputums betrug pH 6,8.

Methode B:

Aus der Überlegung, daß vielleicht das GL in dem Zentrifugat (siehe oben) geblieben ist bzw. sich nicht gelöst hat, wurde das Zentrifugat mit Äther gemischt und 30 min gerührt (das GL ist gut löslich in Äther). Nach Filtration wurde der Äther im Rotationsverdampfer abgezogen, der Rückstand in Äthanol gelöst und wie in II.1.3.c dialysiert.

Methode C:

Da der pH des Sputums 6,8 betrug und sich das GL erst unter pH 5,5 in Äther löst, wurde in einem weiteren Versuch das Sammelsputum mit 0,1 N HCl auf pH 3 eingestellt und mit dem gleichen Volumen Diethyläther über Nacht bei Raumtemperatur gerührt (Magnetrührer, Janke & Kunkel). Die Ätherphase wurde nach Zentrifugation (20 min, 2000 U/min) abgenommen. Nach dem Eindampfen des Äthers wurde der Rückstand in 0,9% Kochsalzlösung aufgenommen und auf pH 7,2 eingestellt.

Die Hämolysetests wurden auf PVC-U-Mikrotiterplatten (Falcon Plastics, Heidelberg) durchgeführt. In jedem Näpfchen wurden 60 µl des bearbeiteten Sputums, 75 µl Veronalpuffer pH 7,2 und 10 µl einer 10%igen Lösung gewaschener menschlicher Erythrozyten eingesetzt. Beurteilt wurde eine Hämolyse der Erythrozyten nach einer Inkubationszeit von 120 min bei 37°C im Brutschrank.

4.2 Gaschromatographie und Massenspektrometrie (57)

Das Sputum eines CF-Patienten mit einer gesicherten P.aeruginosa-Lungeninfektion wurde abzentrifugiert (2000 U/min, 15 min). Der Überstand wurde mit einer 3,7 M $ZnCl_2$-Lösung versetzt bis zu einer Konzentration von 75 mM nach der Methode von Hirayama (17). Die Lösung wurde 3 Tage bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Das Präzipitat wurde abzentrifugiert und lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde 2 Stunden mit Diethyläther - unter Rückfluß - versetzt. Der Diethyläther wurde dann im Rotationsverdampfer abgezogen und der Rückstand weiter bearbeitet und analysiert wie in II.1.4.1.b.

III. Ergebnisse

1 GEWINNUNG DES GL

Nach dem Vergleich der angegebenen Medien in II.1.1.b wurden die besten Ergebnisse mit dem Medium nach Hauser und Karnovsky (15) erzielt, die als Kohlenstoff-Donator Glycerin einsetzten. Die GL-Produktion war höher als bei den anderen Medien.

1.1 Reinigung und Kristallisation

Bei der Erprobung der in II.1.1.3 angegebenen Methoden wurden die besten Ergebnisse bezüglich der Mengen und der Reinheit mit der eigenen Methode erzielt (Tabelle 1).

Nach gaschromatographischen Analysen enthielten die gewonnenen Präparationen nach der Methode von Johnson und Boese (26) und Jarvis und Johnson (25) außer dem GL andere Substanzen wie Xylose, Mannose und Glucose. Die nach der eigenen Methode gewonnene Präparation enthielt nur GL und NaCl und wies keine anderen Verunreinigungen auf.

TABELLE 1: Menge und Reinheit des GL

	Menge (g)	Reinheit
Johnson-Boese-Methode	- a	20%
Jarvis-Johnson-Methode	ca. 0,6	3%
Eigene Methode	1,5	45%

a: Hier erfolgte keine Kristallisation. Das Dialysat wurde analysiert.

Das gewonnene GL ist eine farblose, kristalline Substanz, die in Äther, Aceton, Dioxan und Äthanol sehr gut löslich ist und in Wasser und Petrol-Äther fast unlöslich ist.

1.2 Nachweismethoden

1.2.1 Chemisch-physikalische Nachweismethoden

a) Dünnschichtchromatographie

Das GL auf der Folie erscheint unter UV-Licht als ellipsoider Fleck. Der R_f-Wert des GL betrug 0,43 und entsprach damit auch dem von Johnson und Boese (26) gefundenen Wert.

b) Gaschromatographie und Massenspektrometrie

Aufgrund der gaschromatographischen und massenspektrometrischen Analysen ließen sich die folgenden Komponenten des GL darstellen (Abb. 2, C und D):

- Trimethylsilyl- (TMS)-Glycerol (Peak 1)
- TMS-β-hydroxydecanoid (Peak 2)
- TMS-methylrhamnosid (Peak 3)
- TMS-Arabitol (Peak 4)

Ferner ist aus dem Gaschromatogramm (Abb. 2 C) und dem Massenspektrum (Abb. 2 D) ersichtlich, daß die GL-Präparation frei von Verunreinigungen war.

1.2.2 Biologische Nachweismethoden

Die Ergebnisse des passiven Hämolysetests wurden nach einer Inkubationszeit von 1 Stunde (A_1, siehe Tabelle 2) und 2 Stunden (A_2) bei 37°C im Brutschrank abgelesen.

Wie aus der Tabelle 2 zu entnehmen ist, sind 6,25 µg GL (Verdünnung 1:8) imstande, mindestens $780 \cdot 10^3$ Erythrozyten (siehe II.1.4.2) zu hämolysieren.

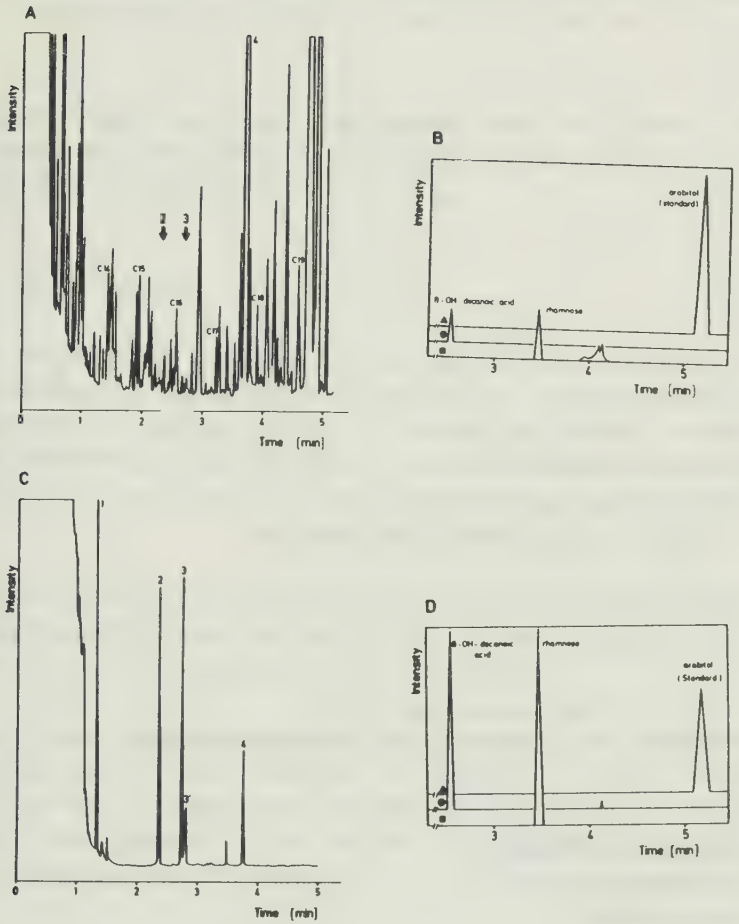

Abb. 2: Gaschromatographie und Massenspektrometrie

- Gaschromatographie: A: Sputum
  C: Glykolipid
- Massenspektrometrie: B: Sputum
  D: Glykolipid

TABELLE 2: Hämolysetest mit GL

		1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
A	A_1	++	++	++	++	+	-	-	-
	A_2	++	++	++	++	+	-	-	-
B	B_1	-	-	-	-	-	-	-	-
	B_2	-	-	-	-	-	-	-	-

A: 50µl GL-Verdünnungsreihe
85µl Veronalpuffer PH 7,2
10µl einer 10%igen Erythrozyten-Suspension

A_1 nach 60 min.
A_2 nach 120 min.

B : 135µl Veronalpuffer PH 7,2
(Kontrolle) 10µl einer 10%igen Erythrozyten-Suspension

++ : vollständige Hämolyse
+ : unvollständige Hämolyse
- : keine Hämolyse

2 NACHWEIS VON SPEZIFISCHEN ANTIKÖRPERN GEGEN DAS GL IN SEREN VON PATIENTEN MIT CYSTISCHER FIBROSE

Aus der Überlegung, daß die hämolytische Aktivität des GL durch Antikörperbindung abgeschwächt bzw. aufgehoben werden könnte, wurde dieser Test durchgeführt.

2.1 Passive Hämolyse

Zur Durchführung dieses Versuches wurden 20 Seren benutzt, die von 20 verschiedenen CF-Patienten mit einer sicheren chronischen P.aeruginosa-Infektion gewonnen wurden. Die serologischen Versuche wurden mit verschiedenen Konzentrationen - 1:1, 1:2, 1:5 - dieser Seren durchgeführt. Als Kontrollen wurden Seren von gesunden Patienten verwendet.

Auf die Reihenfolge des Einsatzes der Reagenzien in den Näpfchen der Mikrotiterplatten wurde stets geachtet und in allen Tabellen bei der Aufzählung der Reagenzien diese Reihenfolge eingehalten.

Das Ergebnis bei allen 20 Seren war gleich; deshalb wurde nachfolgend nur eine dieser Tabellen als Beispiel wiedergegeben. Tabelle 3 zeigt eine Hemmung der hämolytischen Aktivität des GL durch die CF-Patienten-Seren. Diese Hemmung ist auch bei der Verwendung von gesunden Patienten-Seren (Kontrolle) vorhanden.

TABELLE 3: Passive Hämolyse

		1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
A	A_1	++	+	-	-	-	-	-	-
	A_2	+	+	-	-	-	-	-	-
B	B_1	++	+	-	-	-	-	-	-
	B_2	++	+	-	-	-	-	-	-
C	C_1	-	-	-	-	-	-	-	-
	C_2	-	-	-	-	-	-	-	-

A: 50µl GL-Verdünnungsreihe
60µl Cystische-Fibrose-Patienten-Seren
25µl Veronalpuffer PH 7,2
10µl einer 10%igen Erythrozyten-Suspension

A_1 nach 60 min.
A_2 nach 120 min.

B : 50 µl GL-Verdünnungsreihe
(Kontrolle) 60µl Gesunde-Patienten-Serum
25µl Veronalpuffer
10µl einer 10%igen Erythrozyten-Suspension

C: 50µl Veronalpuffer (statt GL-Verdünnungsreihe)
60µl Cystische-Fibrose-Patienten-Serum
25µl Veronalpuffer
10µl einer 10%igen Erythrozyten-Suspension

++ : vollständige Hämolyse
+ : unvollständige Hämolyse
- : keine Hämolyse

2.2 Passive Hämolyse und Zusatz von Komplement

Auch zu diesem Versuch wurden 20 Seren von verschiedenen CF-Patienten mit einer sicheren chronischen P.aeruginosa-Pneumonie verwendet.

Im Anschluß an die Arbeit von Löffler (44) wurden die Versuche unter Zusatz von Komplement durchgeführt. Das Serum von gesunden Patienten wurde durch 30-minütiges Erwärmen bei 56°C im Wasserbad komplementaktiviert.

Tabelle 4 zeigt eine Abschwächung der hämolytischen Potenz des GL bei der Verwendung von CF-Patienten-Seren, unter Zusatz von Komplement, wie auch bei den Kontrollen.

TABELLE 4: Passive Hämolyse und Zusatz von Komplement

		1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
A	A_1	++	+	-	-	-	-	-	-
	A_2	++	+	-	-	-	-	-	-
B	B_1	++	+	-	-	-	-	-	-
	B_2	++	+	-	-	-	-	-	-
C	C_1	++	+	-	-	-	-	-	-
	C_2	++	+	-	-	-	-	-	-

A : 50µl GL-Verdünnungsreihe
60µl Cystische-Fibrose-Patienten-Serum
20µl Komplement
5µl Veronalpuffer
10µl einer 10%igen Erythrozyten-Suspension

A_1 nach 60 min.
A_2 nach 120 min.

B : 50µl GL-Verdünnungsreihe
(Kontrolle 1) 60µl inaktiviertes Serum
20µl Komplement
5µl Veronalpuffer
10µl einer 10%igen Erythrozyten-Suspension

C: 50µl GL-Verdünnungsreihe
(Kontrolle 2) 60µl inaktiviertes Serum
25µl Veronalpuffer
10µl einer 10%igen Erythrozyten-Suspension

++: vollständige Hämolyse
+: unvollständige Hämolyse
-: keine Hämolyse

2.3 Passive Hämolyse mit subhämolytischer GL-Konzentration und Zusatz von Komplement

Für diesen Versuch wurden ebenfalls 20 Seren von CF-Patienten mit einer sicheren chronischen P.aeruginosa-Pneumonie verwendet. Es wurde aber mit einer subhämolytischen GL-Verdünnung (1:64) gearbeitet (siehe Tabelle 2).

Die Reihenfolge in diesem Versuch wurde dahingehend geändert, daß 10 µl einer 10%igen gewaschenen menschlichen Erythrozyten-Suspension in 50 µl einer 1:64 GL-Verdünnung 30 min inkubiert wurden und anschließend die Seren zugegeben wurden.

Die Versuche wurden mit verschiedenen Verdünnungen der CF-Patienten-Seren (1:1, 1:5 und 1:10) durchgeführt:

	Serumverdünnung		
	1:1	1:5	1:10
Patient x	-	-	-

Die Versuche mit den 20 CF-Patienten-Seren waren alle negativ, das heißt, sie zeigten bei einer GL-Konzentration von 1:64 keine Hämolyse.

3 CHEMILUMINESZENZ

Abb. 3 zeigt, daß die Konzentration von 4 µg GL/ml (Verdünnung 1:100) die Chemilumineszenz der gereinigten PMN völlig hemmen, während Konzentrationen von 0,8 µg GL/ml keinen wesentlichen Effekt zeigen.

4 CHEMOTAXIS

Wie man der Tabelle 5 entnehmen kann, hat das GL einen hemmenden Effekt auf die PMN-Chemotaxis. In niedrigen GL-Konzentrationen von 1:2000 ist die Chemotaxis der PMN bis zu 22% gehemmt. Höhere GL-Konzentrationen (1:10 d.h. 40 µm GL/ml) hemmen die Chemotaxis der PMN bis zu 46%.

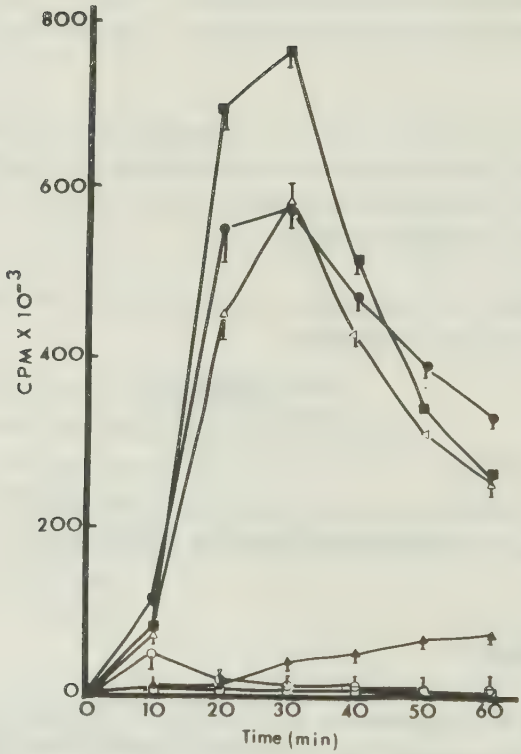

Abb. 3: Wirkung des GL auf die Chemilumineszenz der PMN.
GL-Verdünnungen: 1:100 (▫—▫), 1:200 (o—o),
1:500 (Δ—Δ), 1:1000(▪—▪),
Puffer: (•—•)

Tabelle 5: Wirkung des GL auf die Chemotaxis der PMN (siehe Text)

GL-Konzentration	Anzahl der durch den Filter gewanderten PMN PMN/Filterfeld					Mittelwert der Filterfelder	Mittelwert der Filter	% der Kontrolle	% der Hemmung
1:10	152	171	98	133	162	143			
	148	167	79	92	122	121	142	54%	46%
	179	161	176	161	136	162			
1:100	152	132	176	218	105	156			
	285	184	208	182	162	204	168	64%	36%
	106	101	174	148	199	145			
1:200	301	358	278	293	285	303			
	146	161	179	167	121	155	210	79%	21%
	200	171	119	182	199	174			
1:2000	184	199	188	246	229				
	195	159	176	171	123	164	205	78%	22%
	287	218	260	221	218	241			
Kontrolle	149	199	255	348	147	220			
	235	251	292	335	369	296	264	100%	-
	135	370	328	281	263	275			

5 NACHWEIS VON GL IM SPUTUM VON PATIENTEN MIT CYSTISCHER FIBROSE

5.1 Passive Hämolyse

Alle durchgeführten hämolytischen Tests zum Nachweis von GL im Sputum von CF-Patienten waren negativ. Die Grenze der Empfindlichkeit dieser Tests betrug 6,25 µg GL/ml, das heißt, daß möglicherweise das GL in geringerer Konzentration vorhanden war. Daher wurde eine empfindlichere Methode (GLC/MS) gewählt.

5.2 Gaschromatographie und Massenspektrometrie (GLC/MS)

Im Sputum von CF-Patienten mit gesicherter P.aeruginosa-Lungeninfektion wurde für das GL eine Konzentration von 0,01 bis 8 µg/ml Sputum gefunden (Tabelle 6). Wie man aus Abbildung 2 entnehmen konnte, war der Peak für das β-hydroxydecan-säure-derivat (Abb. 2 C, Peak 2) ebenso im Chromatogramm des Sputums von Patient 5 (Abb. 2 A) nachweisbar. Daß es sich hierbei tatsächlich um β-hydroxydecansäure handelte, ließ sich durch GLC/MS-Analysen bestätigen. Abbildung 2 D zeigt das Massenspektrum des gereinigten GL; die charakteristischen Peaks der einzelnen Komponenten ließen sich ebenso im Massenspektrum des Patientensputums darstellen (Abb. 2 B). Die maximale nachgewiesene GL-Konzentration in den Sputen von CF-Patienten lag bei 8 µg. Daraus ließ sich schließen, daß die verwendeten Sputumkonzentrationen bei den hämolytischen Tests (II. 4.1) zum Nachweis von GL im Sputum zu niedrig waren. Dementsprechend waren alle hämolytischen Tests negativ.

TABELLE 6: Gehalt des GL in Cystische-Fibrose-Patienten-Sputen

Patient Nr.	Konzentration des GL pro ml Sputum (µg/ml)	
	Methode A	Methode B
1	-	8
2	-	0,5
3	0,5	0,8
4	0,1	0,01
5_1	6	-
5_2	0,3	0,3
6	1	7

Methode A: Quantifizierung des GL-Gehalts durch Einbeziehung des GLC-Peaks.

Methode B: Quantifizierung des GL-Gehalts durch Normierung des Retentionsindexes im Massenspektrum zu dem des Standard-Peaks.

5_1 : Bestimmung des GL-Gehalts vor der antibiotischen Therapie

5_2 : Bestimmung des GL-Gehalts 9-11 Tage nach Beginn der antibiotischen Therapie.

IV. Diskussion

Das GL stellt neben anderen ebenfalls von P.aeruginosa gebildeten Toxinen eine weitere extrazelluläre Substanz dar. Die GL-Produktion durch P.aeruginosa hängt von sehr vielen Faktoren ab (25, 26). Johnson und Boese (26) berichteten, daß die Anwesenheit von Phosphat sowie von höheren Konzentrationen an Glycerin die GL-Bildung durch P.aeruginosa verringert.

Für die Reinigung und die Kristallisation des GL wurden in der Literatur verschiedene Methoden angegeben. Aus praktischen Gründen wurden die Methoden von Johnson und Boese (26) und Jarvis und Johnson (25), die unterschiedliche Ergebnisse erzielten, untersucht.

Aus diesen Beobachtungen ergibt sich, daß die Wahl des Stammes und des Mediums sowie des Reinigungs- und Kristallisationsverfahrens eine wichtige Rolle für die GL-Produktion und dessen Reinigung spielen.

In der vorliegenden Arbeit wurden drei verschiedene Medien, die am meisten verwendet werden, untersucht. Die besten Ergebnisse wurden mit dem Medium von Jarvis und Johnson (25), die das Glycerin als Kohlenstoffdonator für das GL einsetzten, erzielt. Ein ähnliches Ergebnis fanden Johnson und Boese (26).

Bei der Reinigung und Kristallisation des GL durch die Methode von Johnson und Boese (26) sowie Jarvis und Johnson (25) waren die gewonnenen GL-Präparationen durch andere Zucker wie Xylose, Mannose und Glucose verunreinigt. Außerdem war die Menge des GL niedrig. Es wurde deshalb in dieser Arbeit eine neue Methode entwickelt, die eine Kombination mit einigen Modifikationen der beiden oben erwähnten Methoden darstellt. Mit der eigenen Methode wurde eine größere Menge an GL gewonnen. Die GL-Präparation war reiner als bei den zwei untersuchten Methoden. Es konnte keine organische Verunreinigung festgestellt werden.

Über die Antigenität von Glykolipiden wurde bereits berichtet (67). Eine Antikörperbildung gegen Glykolipide könnte stattfinden. Da das GL ein

Hapten ist, könnte nur seine Bindung an einen Carrier ihm die Vollantigenitätseigenschaft verleihen. Die Arbeit von Wood und Kabat (67) zeigte, daß Glykolipide inkorporiert in Liposomen immunogen sein können. Eine Antikörperbildung fand bei der Immunisierung von Tieren durch eine mizellare Suspension aus gereinigten Glykolipiden und heterologen Proteinen wie z.B. Albumin statt (45). Aus diesen Beobachtungen und im Anschluß an die Arbeit von Löffler (44) wurden in dieser Arbeit 60 CF-Patienten-Seren auf die Anti-GL-Antikörper untersucht. Die serologischen Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, daß die Seren dieser Patienten die hämolytische Wirkung des GL verringern. Da aber diese abschwächende Wirkung auch mit Seren gesunder Probanden beobachtet wurde, wurde daraus geschlossen, daß diese Hemmung unspezifisch war. Die passive Hämolyse in Gegenwart von Komplement wurde durch die CF-Seren andererseits auch nicht gesteigert.

Diese Ergebnisse zeigten, daß sich mit der vorliegenden Untersuchungsmethode keine spezifischen Antikörper gegen das GL in den Seren von CF-Patienten nachweisen lassen.

An der Immunantwort des Organismus sind die Leukozyten wesentlich beteiligt. Die PMN stehen in vorderster Linie der Abwehr gegen Krankheitserreger und Schadstoffe. Einige Arbeiten haben den Beweis erbracht, daß bei P.aeruginosa-Infektionen die PMN in der Immunabwehr des Organismus eine wichtige Rolle spielen (3, 27, 55, 68). Die erfolgreiche Immunantwort des Organismus gegen P.aeruginosa-Infektionen wird durch die Mobilisierung einer großen Zahl von PMN in das peribronchiale Lungengewebe und eine drastische Reduzierung der Bakterienzahl gekennzeichnet (56). Falls Zahl und Funktion der PMN durch Medikamente (28) oder Krankheitsprozesse (55) beeinträchtigt ist, werden fatale Krankheitsverläufe nach P.aeruginosa-Infektionen beobachtet. Eine verspätete oder beeinträchtigte Immunantwort auf P.aeruginosa-Infektionen scheint dem Mikroorganismus zu ermöglichen, seine extrazelllulären Toxine zu bilden (43). Die Folge von P.aeruginosa-Infektionen scheint also von dem Verhältnis der Bakterien zu den Phagozyten sowie von der Funktion der Phagozyten abzuhängen. Es gibt jedoch wenige Berichte über die Wirkung der extrazellulären Produkte von P.aeruginosa auf die PMN-Funktion (24, 30, 66).

In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb die Wirkung von GL auf zwei wichtige Funktionen der PMN untersucht. Aufgrund der Ergebnisse der durchgeführten Versuche scheint das GL fähig zu sein, die Chemotaxis der PMN teilweise zu hemmen.

Eine weitere Wirkung des GL auf die PMN konnte in dieser Arbeit gezeigt werden: Das GL ist in der Lage, die Chemilumineszenz der PMN zu hemmen. Während der Phagozytose unterziehen sich die PMN einem oxidativen Metabolismus, der eine Strahlung von Licht oder Chemilumineszenz zur Folge hat, wie es ursprünglich von Allen et al. beschrieben wurde (1). Die Arbeiten von Klebanoff (32, 33) konnten zeigen, daß die PMN von chronischen Granulomatosepatienten, die die meisten Bakterien und Pilze nicht töten können, nicht in der Lage waren, Chemilumineszenz zu erzeugen. Das sauerstoffabhängige antimikrobielle System stellt die stärkste bakterizide Wirkung der PMN dar (32,39). Die Hemmung der Chemilumineszenz der PMN durch das GL, wie sie in dieser Arbeit gezeigt wurde, liefert einen weiteren Beweis für die Bedeutung des von P.aeruginosa gebildeten GL als virulentem Faktor bei der Pathogenese von Infektionen, die durch diesen Mikroorganismus hervorgerufen werden.

Bisher ist das GL in vivo nicht nachgewiesen worden. Deswegen wurden in dieser Arbeit Sputen von CF-Patienten mit einer abgesicherten P.aeruginosa-Lungeninfektion auf das GL untersucht. Es wurden verschiedene Methoden verwendet, um das GL im Sputum nachzuweisen. Alle hämolytischen Tests mit dem bearbeiteten Sputum waren negativ, die Empfindlichkeit dieses Testsystems ist jedoch mit 6,25 µg GL/ml relativ gering. Durch die empfindlicheren gaschromatographischen und massenspektrometrischen Analysen konnte das GL in Konzentrationen von 0,01 bis 8 µg/ml Sputum nachgewiesen werden.

Der Nachweis von GL in vivo und seine hämolysierenden Eigenschaften könnten neben dem hemmenden Effekt des GL auf die neutrophilen Granulazyten, der eine Behinderung der Phagozytose des Erregers durch den Wirt darstellt, einen weiteren Hinweis für die Beteiligung des GL an der Pathogenese chronischer P.aerugionosa-Infektionen liefern.

V. Zusammenfassung

Das gram-negative Stäbchen Pseudomonas aeruginosa bildet mehrere extrazelluläre Virulenzfaktoren, die für das pathogene Geschehen der P.aeruginosa-Infektion verantwortlich gemacht werden. Das Glykolipid (GL), einer dieser extrazellulären Virulenzfaktoren, wurde durch ein neuentwickeltes Verfahren gereinigt. Als Nachweismethode wurden hämolytische Tests, die Dünnschichtchromatographie und gaschromatographische Analysen benützt. Die massenspektrometischen und gaschromatographischen Analysen zeigten, daß die gereinigte GL-Präparation durch keine organische Verunreinigung kontaminiert war.

Zum Nachweis von spezifischen Antikörpern gegen das GL in den Seren von Patienten mit cystischer Fibrose (CF) mit einer, klinisch und bakteriologisch, gesicherten chronischen P.aeruginosa-Lungeninfektion wurden serologische Versuche durchgeführt. Mit den verwendeten Nachweismethoden konnten keine spezifischen Antikörper gegen das GL nachgewiesen werden.

Die polymorphkernigen Leukozyten (PMN) spielen in der Immunabwehr bei CF-Patienten mit P.aeruginosa-Lungeninfektion eine dominierende Rolle. Auf zwei wichtige Funktionen der PMN wurde die Wirkung des GL untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß das GL in einer Konzentration von 4 µg/ml die Chemilumineszenz völlig hemmt und die Chemotaxis mit einer Konzentration von 40 µg/ml bis zu 46% hemmt.

Biologische Tests und chemisch-physikalische Analysen wurden verwendet, um das GL in vivo nachzuweisen. Durch die gaschromatographischen und massenspektrometrischen Analysen wurde gezeigt, daß das GL im Sputum von CF-Patienten mit einer chronischen P.aeruginosa-Infektion in Konzentrationen von 0,01 bis 8 µg/ml sich befindet.

Literaturverzeichnis

1. Allen, C., R.L. Stjernholm and R.H. Steel. 1972.
Evidence for an electronic excitation state(s) in human polymorphonuclear leukocytes and its participation in bactericidal activity. Biophys. Res. Commun. 47:679-684

2. Bøyum, A. 1968.
Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 21:77-89

3. Bullen, J.J., S.N. Wallis and E. Griffiths. 1976.
The effect of antipolymorphonuclear leukocyte serum on Pseudomonas aeruginosa infection in rabbits. Immunology 30:603-610

4. Burns, M.W. and May, J.R. 1968.
Bacterial precipitins in serum of patients with cystic fibrosis. Lancet 1:270-272

5. Butler, V.P. and Beisser, S.M. 1973.
Antibodies to small molecules. Adv. Immunol. 17:253-310

6. Callahan, L.T. 1976.
Pseudomonas aeruginosa exotoxin: purification by preparative polycrylamide gel electrophoresis and the development of a higly specific antitoxin serum. Infect. Immun. 14:55-61

7. Cross, A.S., Sadoff, J.C., Iglewski, B.H. and Sokol, P.A. 1980.
Evidence for the role of Toxin A in the pathogenesis of infection with Pseudomonas aeruginosa in humans. J. Infect. Dis. 142:538-546

8. Di sant'Agnese, P.A. and Davis, P.B. 1976.
Research in cystic fibrosis. N. Engl. J. Med. 295:597-602

9. Döring, G., Obernesser, H.J. und Botzenhart, K. 1981.
Extrazelluläre Toxine von Pseudomonas aeruginosa II. Einwirkung zweier gereinigter Proteasen auf die menschlichen Immunoglobuline IgG, IgA und sekretorische IgA. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 249:89-98

10. Döring, G., Buhl, V., Høiby, N., Schiøtz, P.O. and Botzenhart, K. 1984.
Detection of proteases of Pseudomonas aeruginosa in immune complexes isolated from the sputum of cystic fibrosis patients. Acta. Pathol. Microbiol. Scand. Sect. C 92:307-312

11. Döring, G. and Høiby, N. 1983.
Longitudinal study of immune response to Pseudomonas aeruginosa antigens in cystic fibrosis. Infect Immun. 42:197-201

12. Döring, G., Obernesser, H.J., Botzenhart, K., Flehmig, B., Høiby, N. and Hofmann, A. 1983.
Proteases of Pseudomonas aeruginosa in patients with cystic fibrosis. J. Infect. Dis. 147:744-750

13. Doggett, R.G. and Harrison, G.M. 1969.
In: Proceedings of the 5th International cystic fibrosis conference, Cambridge, 175-188. Cystic fibrosis Research Trust, London

14. Edwards, J.R. and Hayashi, J.A. 1965.
Structure of rhamnolipid from Pseudomonas aeruginosa. Arch. Biochem. Biophys. 111:415-421

15. Hauser, G. and Karnovsky, M.L. 1954.
Studies on the production of glycolipid by Pseudomonas aeruginosa. J. Bacteriol. 68:645-654

16. Hingley, S.T., Hastle, A.T., Kueppers, F., Higgins, M.L., Weinbaum, G. and Shryock, T. 1986.
Effect of ciliostatic factors from Pseudomonas aeruginosa on rabbit respiratory cilia. Infect. Immun. 51:254-262

17. Hirayama, T. and Kato, J. 1982.
Novel methylrhamnolipid from Pseudomonas aeruginosa. FEBS Lett. 139:81-85

18. Høiby, N. 1977.
Pseudomonas aeruginosa infection in cystic fibrosis: diagnostic and prognostic significance of Pseudomonas aeruginosa precipitins determined by means of crossed immunoelectrophoresis, a survey. Acta path. microbiol. scand. sect. C (suppl.) 262:1-96

19. Høiby, N., Flensborg, E.W., Beck, B., Friis, B., Jacobsen, S.V. and Jacobsen, L. 1977.
Pseudomonas aeruginosa infection in cystic fibrosis. Diagnostic and prognostic significance of Pseudomonas aeruginosa precipitins determined by means of crossed immunoelectrophoresis. Scand. J. Resp. Dis. 58:65-79

20. Homma, J.Y., Tomiyama, T., Sano, H., Hirao, Y. and Saku, K. 1975.
Passive hemagglutination reaction test using formalinised sheep erythrocytes treated with tannic acid and coated with protease or elastase of Pseudomonas aeruginosa. Jpn. J. Exp. Med. 45: 361-365

21. Iglewski, B. and Kabat, D. 1975.
NAD-dependent inhibition of protein synthesis by Pseudomonas aeruginosa toxin. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72:2284-2288

22. Isselbacher, K.J., Adams, R.D., Braunwald, E., Petersdorf, R.G. and Wilsin, J.D. 1980.
Harrison's principles of internal medicine. Mc Graw Hill Kogakusha LTD., 9. Aufl. S. 1233ff.

23. Itoh, S., Honda, H., Tomita, F. and Suzuki, T. 1971.
Rhamnolipids produced by Pseudomonas aeruginosa grown on n-paraffin (mixture of C_{12}, C_{13} and C_{14} fractions). J. Antibiot. 24: 855-859

24. Jagger, K.S., Robinson, D.L., Franz, M.N. and Warren, R.L. 1982.
Detection by enzyme-linked immunosorbent assays of antibody, specific for Pseudomonas proteases and exotoxin A in sera from cystic fibrosis patients. J. Clin. Microbiol. 15:1054-1058

25. Jarvis, F.G. and Johnson, M.J. 1949.
A glycolipid produced by Pseudomonas aeruginosa. J. Am. Chem. Soc. 71:4124-4126

26. Johnson, M.K. and Boese-Marazzo, D. 1980.
Production and properties of heat-stable extracellular hemolysin from Pseudomonas aeruginosa. Infect. Immun. 29:1028-1033

27. Jones, R.J. and Dyster, R.E. 1973.
The role of PMN leukocytes in protecting mice vaccinated against Pseudomonas aeruginosa infections. Br. J. Exp. Pathol. 54:416

28. Kharazmi, A., Valerius, N.H. and Høiby, N. 1983.
Effect of antimalarial drugs on human neutrophil chemotaxis in vitro. Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. C Immunol. 91:293-298

29. Kharazmi, A., Döring, G., Høiby, N. and Valerius, N.H. 1984.
Interaction of Pseudomonas aeruginosa alkaline protease and elastase with human polymorphonuclear leukocytes in vitro. Infect. Immun. 43:161-165

30. Kharazmi, A., Høiby, N., Döring, G. and Valerius, N.H. 1984.
Pseudomonas aeruginosa exoprotease inhibit human neutrophil chemiluminescence. Infect. Immun. 44:587-591

31. Kiefer, H. 1979.
The chemical modifications of proteins haptens and solid supports. Immunological Methods. S. 137-150

32. Klebanoff, S.J. 1975.
Antimicrobial mechanisms in neutrophilic polymorphonuclear leukocytes. Semin. Hematol. 12:117-142

33. Klebanoff, S.J. and Hamon, C.B. 1972.
Role of myeloperoxidase-mediated antimicrobial systems in intact leukocytes. J. Reticuloendothel. Soc. 12:170-196

34. Klinger, J.D., Straus, D.C., Hilton, C.B. and Bass, J.A. 1978.
Antibodies to proteases and exotoxin A of Pseudomonas aeruginosa in patients with cystic fibrosis. Demonstration by radioimmunassay. J. Infect. Dis. 139:9-58

35. Kreger, A.S. and Gray, L.D. 1978.
Purification of Pseudomonas aeruginosa proteases and microscopic characterisation of pseudomonal-protease induced rabit corneal damage. Infect. Immun. 19:630-648

36. Kurioka, S. and Liu, P.V. 1967.
Effect of the hemolysin of Pseudomonas aeruginosa on phosphatides and phospholipase C activity. J. Bacteriol. 93:670-674

37. Landsteiner, K. and Simms, S. 1923.
Production of heterogenetic antibodies with mixtures of the binding part of the antigen and protein. J. Exp. Med. 38:127

38. Lehrer, R.L. and Cline, M.J. 1969.
Leukocytes myeloperoxidase deficiency and disseminated candidiasis: the role of myeloperoxidase in resistance of candida infections. J. Clin. Invest. 48:1478-1488

39. Leisinger, T. and Margraff, R. 1979.
Secondary metabolites of the fluorescent Pseudomonads. Microbiol. Revies. 43:422-442

40. Liu, P.V. 1974.
Extracellular toxins of Pseudomonas aeruginosa. J. Infect. Dis. 130: suppl. 96

41. Liu, P.V. 1966.
The roles of various fractions of Pseudomonas aeruginosa in its pathogenesis. II. Effects of lecithinase and protease. J. Infect. Dis. 116:112-116

42. Liu, P.V. and Hsieh, H. 1969.
Inhibition of protease production of various bacteria by ammonium salts: its effect on toxin production and virulence. J. Bacteriol. 99:406-413

43. Liu, P.V. 1979.
Toxins of Pseudomonas aeruginosa - clinical manifestations of infection and current therapy. In: Doggett, R.G. (Ed.): Pseudomonas aeruginosa. Academic Press Inc. New York; S. 63-68

44. Löffler, W. 1984.
Versuche zur Erzielung von Antikörpern gegen das hitzestabile Hämolysin von Pseudomonas aeruginosa. Dissertation. Tübingen

45. Marcus, D.M. and Schwarting, G.A. 1976.
Immunochemical properties of glycolipids and phospholipids. Adv. Immunol. 23:203-241

46. Meinke, G., Barum, J., Rosenberg, B. and Berke, R.S. 1970.
In vivo studies with the partially purified protease (elastase) from Pseudomonas aeruginosa. Infect. Immun. 2:583-589

47. Middlebrook, J.L., Dorland, R.B. 1977.
Response of cultured mammalian cells to exotoxins of Pseudomonas aeruginosa and Cornyebacterium diphtheriae differential cytotoxicity. Can. J. Microbiol. 23:183-189

48. Morihara, K. 1963.
Pseudomonas aeruginosa proteinase. I. Purification and general properties. Biochem. Biophys.Acta. 73:113-124

49. Morihara, K. 1964.
Production of elastase and proteinase by Pseudomonas aeruginosa. J. Bacteriol. 88:745-757

50. Morihara, K. and Tsuzuki, H. 1964.
Pseudomonas aeruginosa peptide peptidohydrolase. III. Some characters as a Ca-metallenzyme. Biochim. Biophys. Acta. 92:351-360

51. Morihara, K., Tsuzuki, H., Okada, T., Inoue, H. and Ebata, M. 1965. Pseudomonas aeruginosa elastase. Isolation, crystallisation, and preliminary characterisation. J. Biol. Chem. 240:3295-3304

52. Morihara, K. and Tsuzuki, H. 1977. Production of protease and elastase by Pseudomonas aeruginosa strains isolated from patients. Infect. Immun. 15:679-685

53. Müller, H.E. 1971. Methodische Untersuchungen zur Einwirkung bakterieller Proteasen auf menschliche Plamaeiweißkörper, dargestellt am Beispiel von Pseudomonas aeruginosa. Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. 216:79-87

54. Pavloskis, O.R. and Gordon, F.B. 1972. Pseudomonas aeruginosa exotoxin: effect on cell culture. J. Infect. Dis. 125:631-636

55. Pennington, J.E. and Ehrie, M.G. 1978. Pathogenesis of Pseudomonas aeruginosa pneumonia during immunosuppression. J. Infect. Dis. 137:764-774

56. Pennington, J.E., Reynolds, H.Y. and Carbone, P.R. 1973. Pseudomonas pneumonia. Amer. J. Med. 55:155-160

57. Peterson, G. 1969. Mass spectrometry of alditols as trimethylsilyl derivatives. Tetrahedron. 25:4437-4443

58. Pollack, M. 1983. The role of exotoxin A in Pseudomonas disease and immunity. Rev. Infect. Dis. 5:715-722

59. Pollack, M., Callahan, L.T. and Taylor, N.S. 1976. Neutralizing antibody of Pseudomonas aeruginosa exotoxin in human sera: evidence for in vivo production during infection. Infect. Immun. 14:942-947

60. Pulverer, G., Wegrzynowicz, H.L. and Jeljaszewicz, J. 1980.
Einfluß von Pseudomonas aeruginosa Proteasen auf Prothrombin, Plasminogen und Fibrinogen. Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A 248:99-109

61. Sabath, L. 1980.
Pseudomonas aeruginosa: the organism, diseases it causes, and their treatment. Hans Huber Publishers. Bern/Stuttgart/Vienna. 1. Aufl.

62. Sierra, G. 1960.
Hemolytic effect of a glycolipid produced by Pseudomonas aeruginosa. Antonie van Leeuwenhol. J. Microbiol. Serol. 26:189-192

63. Snell, K., Holder, I.A., Leppla, S.A. and Saelinger, C.B. 1978.
Role of exotoxin and protease as possible virulence factors in experimental infection with Pseudomonas aeruginosa. Infect. Immun. 9:839-845

64. Speert, D.P. and Hancock, R.E.W. 1985.
Pseudomonas aeruginosa: new therapeutic approaches from basic research. Series Ed. Schönfeld, H. and Hahn, F.E.: Antibiotics and chemotherapy. Basel/München/Paris/London/New York/Tokyo/Sydney

65. Valerius, N.H. 1977.
Neutrophil granulocyte chemotaxis in vitro. Acta. Path. Microbiol. Scand. Med. 85:289-296

66. Weber, B., Nicol, M.M., Jagger, K.S. and Saelinger, C.B. 1982.
Interaction of Pseudomonas exproducts with phagocytic cells. Can. J. Microbiol. 28:679-685.

67. Wood, C. and Kabat, E.A. 1981.
Immunochemical studies of conjugates of isomaltosyl-oligosaccharides. J. Exp. Med. 154:432-449

68. Young, L.S. and Armstrong, D. 1972.
Human immunity to Pseudomonas aeruginosa. I. in vitro interaction of bacteria, polymorphonuclear leukocytes, and serum factors. J. Infect. Dis. 126:257-276

Lebenslauf

Name:	Zouhair Bibi	
Geburtstag:	1.1.1956	
Geburtsort:	Mahares/Tunesien	
Eltern:	Amor Bibi und Mahbouba Bibi, geb. Ben Zina	
Staatsangehörigkeit:	Tunesisch	
Wohnort:	Eduard-Spranger-Str. 80, 7400 Tübingen	
Schulausbildung:	1961-1967	Grundschulbesuch in Mahares
	1967-1974	Gymnasium in Sfax
	1974	Abitur (Baccalauréat français)
Studium:	1974-1975	Biologie an der Naturwissenschaftlichen Universität von Tunis
	1975-1976	Biologie an der Universität Tübingen
	1976-1978	Chemie an der Universität Tübingen
	Oktober 1978	Zulassung zum Medizinstudium an der Universität Tübingen
	März 1981	ärztliche Vorprüfung (Physikum)
	WS 1980/81	wissenschaftliche Hilfskraft im Anatomischen Institut der Universität Tübingen
	März 1982	erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
	Aug./Sept. 1982 und Aug./Sept. 1983	Famulatur im städtischen Krankenhaus Oberndorf
	15.09. - 15.10.1983	Famulatur in der Praxis von Dr. Haffner
	15.12.1983 - 10.01.1984	Famulatur im städtischen Krankenhaus Oberndorf
	März 1984	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
	April 1984 - April 1985	Praktisches Jahr am Kreiskrankenhaus Esslingen
	24. April 1985	dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
	September 1985	Erhalt der Approbation